



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b><br><b>C08B 37/00</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/08206</b><br><b>(43) Date de publication internationale:</b> 6 mars 1997 (06.03.97)  |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/01314<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 août 1996 (23.08.96)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>95/10045 24 août 1995 (24.08.95) <b>FR</b><br><b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) [FR/FR]; 155, rue Jean-Jacques-Rousseau, F-92138 Issy-les-Moulineaux Cédex (FR).<br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> NARDELLA, Alain [FR/FR]; 14, rue Paul-Lafargue, F-92800 Puteaux (FR). CHAUBET, Frédéric [FR/FR]; 4, rue du Bois-Jacques, F-95600 Eaubonne (FR). SINQUIN, Corinne [FR/FR]; 6, rue des Ingénieurs, F-44300 Nantes (FR). COLLIEC JOUAULT, Sylvia [FR/FR]; 13, rue de l'Hippodrome, F-44300 Nantes (FR). BOISSON-VIDAL, Catherine [FR/FR]; 9, rue d'Avron, F-75020 Paris (FR). DURAND, Patrick [FR/FR]; 61, rue de la Commune de 1871, F-44400 Rezé |           | <b>(FR).</b> JOZEFONVICZ, Jacqueline [FR/FR]; 65, deuxième avenue, F-60260 Lamorlaye (FR).<br><b>(74) Mandataires:</b> ORES, Irène etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).<br><b>(81) Etats désignés:</b> JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i><br><i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> |
| <b>(54) Title:</b> METHOD FOR OBTAINING SULPHATED POLYSACCHARIDES<br><b>(54) Titre:</b> PROCEDE D'OBTENTION DE POLYSACCHARIDES SULFATES<br><b>(57) Abstract</b><br><p>A method for obtaining sulphated polysaccharides using the free radical depolymerization of a fucan from Phaeophyceae in the presence of a metal catalyst and of hydrogen peroxide is described. The method of the invention provides polysaccharide fractions with a molecular weight of 10,000 g/mol or less, with anticoagulant properties.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>L'invention est relative à l'obtention de polysaccharides sulfatés par dépolymérisation radicalaire d'un fucane de Phéophycées en présence d'un catalyseur métallique, et de peroxyde d'hydrogène. Le procédé de l'invention permet d'obtenir des fractions polysaccharidiques de masse molaire inférieure ou égale à 10000 g/mol, dotées de propriétés anticoagulantes.</p>   |           |   |

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Arménie                   | GB | Royaume-Uni                                | MW | Malawi                |
| AT | Autriche                  | GE | Géorgie                                    | MX | Mexique               |
| AU | Australie                 | GN | Guinée                                     | NE | Niger                 |
| BB | Barbade                   | GR | Grèce                                      | NL | Pays-Bas              |
| BE | Belgique                  | HU | Hongrie                                    | NO | Norvège               |
| BF | Burkina Faso              | IE | Irlande                                    | NZ | Nouvelle-Zélande      |
| BG | Bulgarie                  | IT | Italie                                     | PL | Pologne               |
| BJ | Bénin                     | JP | Japon                                      | PT | Portugal              |
| BR | Brésil                    | KE | Kenya                                      | RO | Roumanie              |
| BY | Bélarus                   | KG | Kirghizistan                               | RU | Fédération de Russie  |
| CA | Canada                    | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan                |
| CF | République centrafricaine | KR | République de Corée                        | SE | Suède                 |
| CG | Congo                     | KZ | Kazakhstan                                 | SG | Singapour             |
| CH | Suisse                    | LI | Liechtenstein                              | SI | Slovénie              |
| CI | Côte d'Ivoire             | LK | Sri Lanka                                  | SK | Slovaquie             |
| CM | Cameroun                  | LR | Libéria                                    | SN | Sénégal               |
| CN | Chine                     | LT | Lituanie                                   | SZ | Swaziland             |
| CS | Tchécoslovaquie           | LU | Luxembourg                                 | TD | Tchad                 |
| CZ | République tchèque        | LV | Lettonie                                   | TG | Togo                  |
| DE | Allemagne                 | MC | Monaco                                     | TJ | Tadjikistan           |
| DK | Danemark                  | MD | République de Moldova                      | TT | Trinité-et-Tobago     |
| EE | Estonie                   | MG | Madagascar                                 | UA | Ukraine               |
| ES | Espagne                   | ML | Mali                                       | UG | Ouganda               |
| FI | Finlande                  | MN | Mongolie                                   | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FR | France                    | MR | Mauritanie                                 | UZ | Ouzbékistan           |
| GA | Gabon                     |    |  | VN | Viet Nam              |

**PROCÉDÉ D'OBTENTION DE POLYSACCHARIDES SULFATÉS**

La présente Invention est relative à l'obtention de polysaccharides sulfatés de faible masse molaire par dépolymérisation de fucanes extraits de Phéophycées.

Les fucanes sont des polysaccharides sulfatés, présents dans les parois cellulaires des thalles d'algues brunes. Le fucane brut extrait des thalles par extraction acide, est constitué d'une population hétérogène de molécules de masse molaire moyenne élevée (100 000 à 800 000 g/mol), qui sont principalement des polymères d' $\alpha$ -1,2-L-fucose-4-sulfate. Cependant, les fucanes contiennent également une proportion non négligeable d'autres composants, en particulier des chaînes d'acides uroniques, et des sucres neutres tels que du D-xylose, et du D-galactose, et du D-mannose.

Les fucanes possèdent différentes propriétés qui rendent particulièrement intéressante leur exploitation comme source de nouveaux principes actifs thérapeutiques. Il a ainsi été montré qu'ils possédaient des activités anticoagulante, antithrombotique [T. NISHINO et T. NAGUMO, Carbohydr. Res. 229, p. 355-362, (1992) ; Demande EP 0403 377 ; S. COLLIEC et al. Thromb. Res. 64, p. 143-154 (1991) ; S. SOEDA et al. Thromb. Res. 72, p. 247-256 (1993) ;], antivirale [M. BABA et al. J. AIDS, 3, p.493-492, (1990)], antiangiogénique [R. HAHNENBERGER et A. M. JACKOBSON, Glycoconjugate J., 8, 350-353 (1991)] et anti-complémentaire [C. BLONDIN et al., Molecular Immunology, 31, p. 247-253, (1994)]. Il a également été observé qu'ils pouvaient agir comme modulateurs de l'adhésion cellulaire [C.G. GLABE et al., J. Cell Sci, 61, p. 475-490, (1983)], du relargage de facteurs de croissance [D.A. BELFORT et al., J. cell. Physiol. 157, p. 184-189, (1993)], de la prolifération de cellules tumorales [M. ELLOUALI et al., Anticancer Research, 13, p. 2011-2020 (1993) ; D.R.COOMBE et al.,

Int. J. Cancer, 39, p. 82-90, (1987)], et bloquer les interactions spermatozoïde/ovule chez différentes espèces [M.C. MAHONY et al., Contraception, 48, p. 277-289, (1993) ; M.C. MAHONY et al., Contraception, 44, p. 657-5 665, (1991)].

Malgré leur intérêt potentiel, et bien que certaines de leurs propriétés, (par exemple leur activité anticoagulante) soient connues depuis longtemps, les fucanes bruts n'ont pas été utilisés en thérapeutique, à 10 cause de leur masse molaire élevée et de leur hétérogénéité, qui entraînent une mauvaise solubilité, qui rend très difficile la caractérisation des préparations actives et leur obtention reproductible.

Lors de travaux précédents, l'équipe des 15 Inventeurs a mis au point un procédé de lyse ménagée du fucane brut par hydrolyse acide (Demande EP 0403 377), suivie de fractionnement par filtration sur gel, qui permet d'obtenir des fractions polysaccharidiques de masse molaire inférieure ou égale à 20 000 g/mol. Ces 20 fractions conservent les propriétés du fucane brut, telles que l'activité anticoagulante et l'activité anti-complémentaire.

Cependant, l'hydrolyse acide suivie de fractionnement ne permet d'obtenir les fractions de 25 faibles masses molaires qu'avec un rendement médiocre ( $\leq 10\%$  du fucane brut de départ) ; en outre, la caractérisation des fractions obtenues par hydrolyse acide révèle une grande hétérogénéité des polysaccharides en masse comme en composition chimique.

30 Par ailleurs, il a été montré qu'il était possible d'obtenir des fractions polysaccharidiques de faible masse molaire et de composition constante à partir de l'héparine ou du dermatane sulfate, en mettant en oeuvre une réaction de dépolymérisation radicalaire 35 [VOLPI et al., J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 622, p. 13-20, (1993) ; Anal. Biochem. 200, p. 100-107, (1992)]. La

réaction procède par la formation de radicaux libres, issus de la réaction d'un ion métallique ( $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ ) avec le peroxyde d'hydrogène [G. VAN DEDEM et J.I. NIELSEN, Pharmeuropa, 3, 202-218, (1990)]. Ces radicaux libres sont très réactifs et susceptibles de dégrader, à pH neutre, les polysaccharides plus efficacement que l'hydrolyse acide.

Les Inventeurs ont cherché à réaliser la dépolymérisation radicalaire d'une fraction de fucane de haute masse molaire (HMWF) par action du peroxyde d'hydrogène en présence d'acétate de cuivre. Les premiers essais effectués en se conformant au protocole décrit par VOLPI et al. ont conduit à l'obtention de fractions de masses molaires inférieures à 20 000 g/mol et de compositions constantes.

Cependant, pour obtenir des fractions de masses molaires inférieures à 10 000 g/mol, il a été nécessaire de fractionner le produit de dépolymérisation radicalaire, par exclusion stérique, avec pour conséquence une perte de produit voisine de 50%.

Les Inventeurs ont maintenant mis au point un nouveau procédé de dépolymérisation radicalaire, qui permet d'obtenir en une seule étape à partir du fucane brut, et avec un bon rendement, des fractions homogènes de masse molaire inférieure à 10 000 g/mol, sans qu'il soit nécessaire de procéder à un fractionnement complémentaire par exclusion stérique.

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention de polysaccharides sulfatés par dépolymérisation radicalaire, caractérisé en ce que :

a) l'on additionne à un volume  $V_1$  d'un mélange réactionnel comprenant un fucane brut issu de Phéophycées à une concentration comprise entre 5 mg/ml et 100 mg/ml, et en présence d'un catalyseur métallique, un volume  $V_2$  d'une solution de peroxyde d'hydrogène à une concentration comprise entre 5% et 30%, l'addition étant

effectuée en continu et sous agitation pendant 0,5 heures à 10 heures, à un débit par minute compris entre V1/1000 et V1/10, et le mélange réactionnel étant maintenu à un pH compris entre 6 et 8 par ajout continu de soude, et à 5 une température comprise entre 40 et 70°C.

b) l'on recueille les polysaccharides résultant de cette dépolymérisation.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente Invention, le fucane brut issu de Phéophycées 10 est présent dans le mélange réactionnel à une concentration comprise entre 10 mg/ml et 50 mg/ml.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré de la présente Invention, on utilise une solution de peroxyde d'hydrogène à une concentration comprise entre 15 5% et 20%, de préférence de l'ordre de 9 à 10% et à un débit compris entre V1/50 et V1/500, de préférence de l'ordre de V1/100.

Des catalyseurs métalliques utilisables pour la mise en oeuvre de la présente Invention sont par 20 exemple ceux mentionnés dans le Brevet Européen 221 977 au nom de OPOCRIN S.p.A. LABORATORIO FARMACOBIOLOGICO.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente Invention, le catalyseur métallique est présent dans le mélange réactionnel à une concentration comprise 25 entre 0,01 et 0,1 M, de préférence entre 0,01 et 0,05 M.

Le procédé de dépolymérisation radicalaire conforme à l'Invention permet d'obtenir en une seule étape, sans fractionnement préparatif par chromatographie d'exclusion stérique, et avec un bon rendement, des 30 fractions polysaccharidiques homogènes de masse molaire inférieure ou égale à 10 000 g/mol.

Dans le cadre de l'exposé de la présente invention, on entend par : "fraction homogène" une fraction qui, en chromatographie d'exclusion stérique 35 haute performance, présente un seul pic principal représentant une population majoritaire dans la

fraction ; l'indice de polydispersité calculé à partir de ce pic donne une valeur comprise entre 1 et 2.

Avantageusement, le procédé conforme à l'Invention comprend en outre une étape de chromatographie d'échange d'ions, qui peut être effectuée soit avant, soit après la dépolymérisation radicalaire, et à l'issue de laquelle on recueille la fraction qui, lorsque ladite chromatographie est effectuée sur une colonne DEAE-Sépharose CL6B (PHARMACIA), est éluée à une force ionique correspondant à une concentration en NaCl supérieure à 0,8 M, de préférence supérieure à 1M.

La présente Invention a également pour objet les fractions polysaccharidiques susceptibles d'être obtenues par le procédé conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, et qui se réfère à un exemple d'obtention de fractions de polysaccharides sulfatés à partir de fucanes extraits d'algues brunes, en mettant en oeuvre le procédé conforme à la présente invention.

#### EXEMPLE 1:

##### MATERIEL DE DEPART :

Trois préparations de fucane ont été testées comme matériel de départ ; on les désigne respectivement sous les abréviations suivantes :

FS : Préparation de fucoïdane de *Fucus vesiculosus* commercialisée par SIGMA FRANCE.

EA : Extrait acide obtenu à partir d'*Ascophyllum nodosum* selon le protocole décrit par S. COLLIEC et al. [Phytochemistry, 35, p. 697-700, (1994)].

P1 : Fraction de haute masse molaire obtenue par traitement acide de EA, comme décrit dans la Demande de Brevet Européen 403 377 (page 13, Exemple 1, b) A).

**Dépolymérisation radicalaire :**

600 mg de fucane et 80 mg d'acétate de cuivre monohydraté (0,02 M) sont dissous dans 20 ml d'eau bidistillée, dans un réacteur maintenu à 60°C. Une solution à 9% (V/V) de peroxyde d'hydrogène est ajoutée à un débit de 12 ml par heure, et le pH est maintenu à 7,5 par addition continue de NaOH 2M. La réaction est arrêtée au bout de 5 heures. Le pH est ajusté à 5 avec de l'acide acétique, puis de la résine chélatante CHELEX® 100 (BIORAD) est ajoutée afin d'éliminer le cuivre contaminant du milieu. Après neutralisation par la soude 0,1 M la solution est dessalée et lyophilisée.

**Caractérisation des fractions polysaccharidiques :**

- Les masses molaires des différentes fractions de fucane ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC), dans 0,15 M NaCl, 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7, en utilisant une colonne LICROSPHER® Si300 (MERK-CLEVENOT) et une colonne HEMASEC® BIO40 (ALLTECH). Les colonnes ont été calibrées avec des étalons polysaccharidiques suivants : pullulanes : 853 000-5 800 g/mol (POLYMER LABORATORIES, INTERCHIM), dextrane : 1 500 g/mol et melezitose : 522 g/mol (FLUKA), sucrose : 342 g/mol et glucose : 180 g/mol (SIGMA). Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel CHROMSTAR® BRUKER [commercialisé par MERK].

- La teneur en fucose a été déterminée par la méthode cystéine-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [Z. DISCHE, Method Biochem, Anal. 2, p. 313-358, (1955)].

- La teneur en acides uroniques a été établie en utilisant une modification de la méthode m-hydroxydiphényle-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [T.M.C.C. FILISETTI-COZZI et N.C. CARPITTA, Anal. Biochem, 197, p. 157-162, (1991)] et en utilisant l'acide glucuronique comme étalon. L'interférence d'hexoses neutres a été évitée en utilisant du sulfamate de potassium et en procédant à des



contrôles comprenant tous les réactifs à l'exception du m-hydroxydiphényle.

- Le contenu en sulfate des fractions a été déterminé par analyse élémentaire du soufre (S%), et en appliquant la relation suivante : pourcentage de groupes sulfate (%) =  $3,22 \times S\%$ .

- L'azote a été dosé par analyse élémentaire. Les quantités trouvées sont toujours très faibles et aucune trace de la présence soit de fragments de protéines, soit d'acides aminés, ou de sucres contenant de l'azote n'a été détectée. En conséquence, les résultats du dosage sont donnés en azote pur (g/100g).

- La composition en sucres a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

- L'activité anticoagulante de chacun des échantillons de fucane a été déterminée par mesure du TCA (Temps de Céphaline Activée) en utilisant le kit TCA (ORGANON TEKNIKA).

100 µl d'un tampon de contrôle, ou bien d'une solution d'héparine à différentes dilutions (0 à 1 µg/ml) (H410, Institut Choay, SANOFI, 170 UI/mg) ou de dilutions de fucane (0 à 50 µg/ml), sont mélangés avec 100 µl de plasma pauvre en plaquettes (PPP) et 100 µl de réactif TCA. L'ensemble est incubé pendant 3 minutes à 37°C. Le temps de formation du caillot est mesuré après l'addition de 100 µl d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 25 mM.

### RÉSULTATS

Trois dégradations ont été réalisées dans les mêmes conditions selon le protocole décrit ci-dessus, à partir de P1, EA, et FS.

Plusieurs prélèvements ont été effectués au cours de la dépolymérisation et analysés par HPSEC.

Les profils chromatographiques au cours du temps sont représentés sur la figure 1. On obtient en 30 minutes une fraction de masse molaire 66 000 g/mol (figure 1A). Ce produit n'est cependant pas suffisamment

homogène (épaulement à 19 000 g/mol). Entre 60 et 300 minutes, le polysaccharide évolue vers un produit de masse molaire 9 000 g/mol qui possède cette fois un profil chromatographique homogène (figure 1H).

5 Les résultats sont rassemblés dans le tableau I ci-dessous. Les fractions obtenues, au bout de 300 minutes à partir de, P1, EA, et FS, sont respectivement dénommées DRP1, DREA, et DRFS.

10 Le taux d'acides uroniques des fractions issues des dépolymérisations diminue alors que le taux de fucose varie peu (tableau I). Par contre le taux de sulfates de DRP1 et DRFS augmente fortement mais reste constant dans le cas de DREA.

TABLEAU I

| Nom  | Rendement<br>(g/100) | Acide<br>uronique<br>(g/100g) | fucose<br>(g/100g) | -SO <sub>3</sub> Na<br>(g/100g) | Azote<br>(g/100g) | Mc<br>(g/mol)      | I=<br>$\bar{M}_p/\bar{M}_n$ | Activité<br>anticoa-<br>gulante<br>(UI/mg) |
|------|----------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|--|
| P1   |                      | 11,6±0,8                      | 35,8±0,2           | 18,4±0,3                        | 0,2               | 516 000<br>100 000 | ND                          | 10,1±2,0                                   |
| DRP1 | 50                   | 6,5±0,5                       | 32,2±0,1           | 30,1±0,0                        | 0,1               | 7 800              | 2,1                         | 6,8±1,0                                    |
| EA   |                      | 5,7±0,4                       | 31,3±0,1           | 26,1±0,1                        | 0,2               | 556 000            | ND                          | 9,1±2,0                                    |
| DREA | 47                   | 2,6±1,1                       | 36,4±0,1           | 29,7±0,5                        | 0,1               | 8 300              | 1,8                         | 7,7±1,0                                    |
| FS   |                      | 9,1±0,8                       | 46,4±0,3           | 22,5±0,2                        | 0,8               | 94 000<br>30 000   | ND                          | 8,7±1,0                                    |
| DRFS | 45                   | 2,3±0,3                       | 40,9±0,3           | 31,0±0,3                        | 0,2               | 7 000              | 1,2                         | 4,0±1,0                                    |

ND : non déterminé (Fraction trop hétérogène)

Mc : Masse molaire chromatographique déterminée au sommet du pic

 $\bar{M}_p$  : Masse molaire moyenne en poids. $\bar{M}_n$  : Masse molaire moyenne en nombre.

**EXEMPLE 2 :**

Le matériel de départ est un extrait acide EA, obtenu comme l'extrait acide utilisé à l'exemple 1.

**Dépolymérisation radicalaire :**

5 4,5 g de fucane brut EA sont dissous dans 150 ml d'une solution 0,02 M d'acétate de cuivre monohydraté dans un réacteur maintenu à 60°C. Une solution à 9% (V/V) de peroxyde d'hydrogène est ajoutée à un débit de 1,5 ml par minute, pendant 5 heures. Le pH  
10 est maintenu à 7,5 par addition continue de NaOH 2N. Le pH est ajusté à 5 avec de l'acide acétique puis de la résine chélatante CHELEX® 100 (BIORAD) est ajoutée, afin d'éliminer le cuivre contaminant du milieu. Après neutralisation par la soude 0,1 M la solution est  
15 dessalée et lyophilisée.

Les résultats de la réaction de dépolymérisation sont résumés dans les tableaux II et III ci-dessous. Le produit de la dépolymérisation est dénommé EADR.

20

TABLEAU II

| EA<br>(g) | EADR<br>(g) | Rendement<br>(g/100g) | Mc<br>(g/mol) |
|-----------|-------------|-----------------------|---------------|
| 4,5       | 2,0         | 44                    | 6400          |

TABLEAU III

| Nom  | Acide<br>uronique | Fucose         | -SO <sub>3</sub> Na | Azote | Mc      | Activité<br>anti-<br>coagu-<br>lante |
|------|-------------------|----------------|---------------------|-------|---------|--------------------------------------|
| EA   | 5,7<br>(±0,4)     | 31,3<br>(±0,1) | 26,1<br>(±0,1)      | 0,2   | 566 000 | 9,1<br>(±2,0)                        |
| EADR | 1,2<br>(±0,1)     | 40,0<br>(±0,2) | 31,4<br>(±0,2)      | 0,1   | 6400    | 6,8<br>(±1,0)                        |

Les teneurs en acide uronique, fucose,  $-\text{SO}_3\text{Na}$ , et azote, sont exprimées en g/100g ; Mc est exprimée en g/mol ; l'activité anticoagulante est exprimée en UI/mg

**Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions**

5 1 g de EADR a été fractionné par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne (2,6 x 5 x 40 cm) de DEAE SEPHAROSE® CL6B (PHARMACIA).

L'élution a été effectuée à la vitesse de 1,6 ml/mn, d'abord avec de l'eau, puis avec un gradient  
10 linéaire (0 à 2M) de NaCl. L'élution a été suivie à l'aide d'un détecteur conductimétrique (IBF) ; la figure 2 représente un profil d'élution.

Deux fractions (EADREI1 et EADREI2) correspondant à la partie recueillie par élution du  
15 gradient en NaCl ont été collectées, respectivement à des forces ioniques correspondant à 0,75 M NaCl, et 1,5 M NaCl.

Les caractéristiques de ces fractions sont indiquées dans le Tableau IV ci-dessous. Les teneurs en acide uronique,  
20 fucose,  $-\text{SO}_3\text{Na}$ , et azote, sont exprimées en g/100g ; Mc est exprimée en g/mol ; l'activité anticoagulante est exprimée en UI/mg

TABLEAU IV

| Nom     | Acide uro-<br>nique  | Fucose                | $-\text{SO}_3\text{Na}$ | Azote  | Mc   | Activité anti-<br>coagu-<br>lante |
|---------|----------------------|-----------------------|-------------------------|--------|------|-----------------------------------|
| EADREI1 | 2,2<br>( $\pm 0,5$ ) | 6,2<br>( $\pm 0,3$ )  | 12,8<br>( $\pm 0,1$ )   | 0,4    | 2500 | 0,5<br>( $\pm 0,2$ )              |
| EADREI2 | 1,2<br>( $\pm 0,1$ ) | 56,7<br>( $\pm 0,2$ ) | 35,5<br>( $\pm 0,2$ )   | traces | 7200 | 11,3<br>( $\pm 2,0$ )             |

La fraction EADREI1, recueillie à faible force  
25 ionique présente un taux d'acides uroniques élevé et une activité anticoagulante relativement faible. Au contraire

EADREI2 est plus riche en groupements sulfates et en fucose, et son activité anticoagulante est plus importante.

- EXEMPLE 3 : Comparaison des propriétés des fractions**  
5 obtenues par un procédé conforme à l'Invention, avec des fractions de même masse molaire obtenues par hydrolyse acide

Les fractions DREA et Q3 ont toutes deux été obtenues à partir d'une préparation de fucane brut EA.

- 10 La fraction DREA a été obtenue par le procédé de dépolymérisation radicalaire conforme à l'Invention, dans les conditions décrites à l'Exemple 1.

La fraction Q3 a été obtenue par hydrolyse acide ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, 45°C, 90 minutes) du fucane brut EA.

- 15 Les caractéristiques de ces fractions sont indiquées dans le Tableau V ci-dessous.

TABLEAU V

| Nom de la fraction                   | DREA           | Q3             |
|--------------------------------------|----------------|----------------|
| Rendement (g/100g)                   | 47             | 10             |
| Acide uronique<br>(g/100g)           | $2.6 \pm 0,1$  | $4,8 \pm 0,4$  |
| Fucose (g/100g)                      | $36,4 \pm 0,1$ | $43,3 \pm 0,1$ |
| -SO <sub>3</sub> Na (g/100g)         | $29,7 \pm 0,5$ | $27,3 \pm 0,2$ |
| Azote (g/100g)                       | 0,1            | 0,1            |
| Mc (g/mol)                           | 8300           | 9300           |
| I ( $\bar{M}_p/\bar{M}_n$ )          | 1,8            | 1,4            |
| Activité anti-<br>coagulante (UI/mg) | $8,2 \pm 1$    | $4,2 \pm 1$    |

## REVENDICATIONS

1) Procédé d'obtention de polysaccharides sulfatés par dépolymérisation radicalaire, caractérisé en ce que :

5 a) l'on additionne à un volume V1 d'un mélange réactionnel comprenant un fucane brut issu de Phéophycées à une concentration comprise entre 5 mg/ml et 100 mg/ml, et en présence d'un catalyseur métallique, un volume V2 d'une solution de peroxyde d'hydrogène à une  
10 concentration comprise entre 5% et 30%, l'addition étant effectuée en continu et sous agitation pendant 0,5 heures à 10 heures, à un débit par minute compris entre V1/1000 et V1/10, et le mélange réactionnel étant maintenu à un pH compris entre 6 et 8 par ajout continu de soude, et à  
15 une température comprise entre 40 et 70°C.

b) l'on recueille les polysaccharides résultant de cette dépolymérisation.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fucane brut est présent dans le  
20 mélange réactionnel à une concentration comprise entre 10 mg/ml et 50 mg/ml.

3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on utilise une solution de peroxyde d'hydrogène à une concentration  
25 comprise entre 5% et 20%, et à un débit compris entre V1/50 et V1/500.

4) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le catalyseur métallique est présent dans le mélange réactionnel à une  
30 concentration comprise entre 0,01 et 0,1 M.

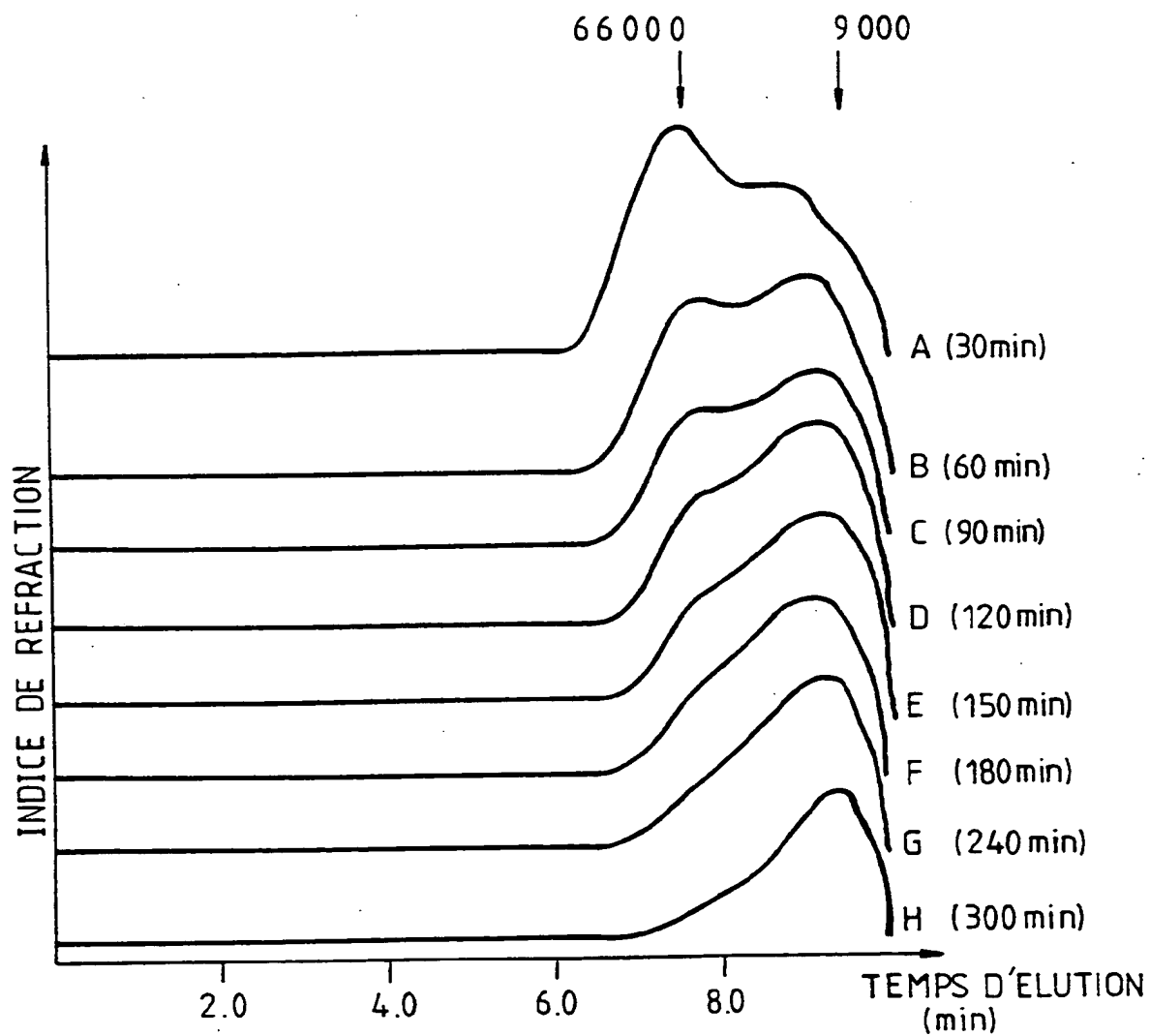
5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de chromatographie d'échange d'ions, qui peut être effectuée soit avant, soit après la  
35 dépolymérisation radicalaire, et à l'issue de laquelle on recueille la fraction qui, lorsque ladite chromatographie



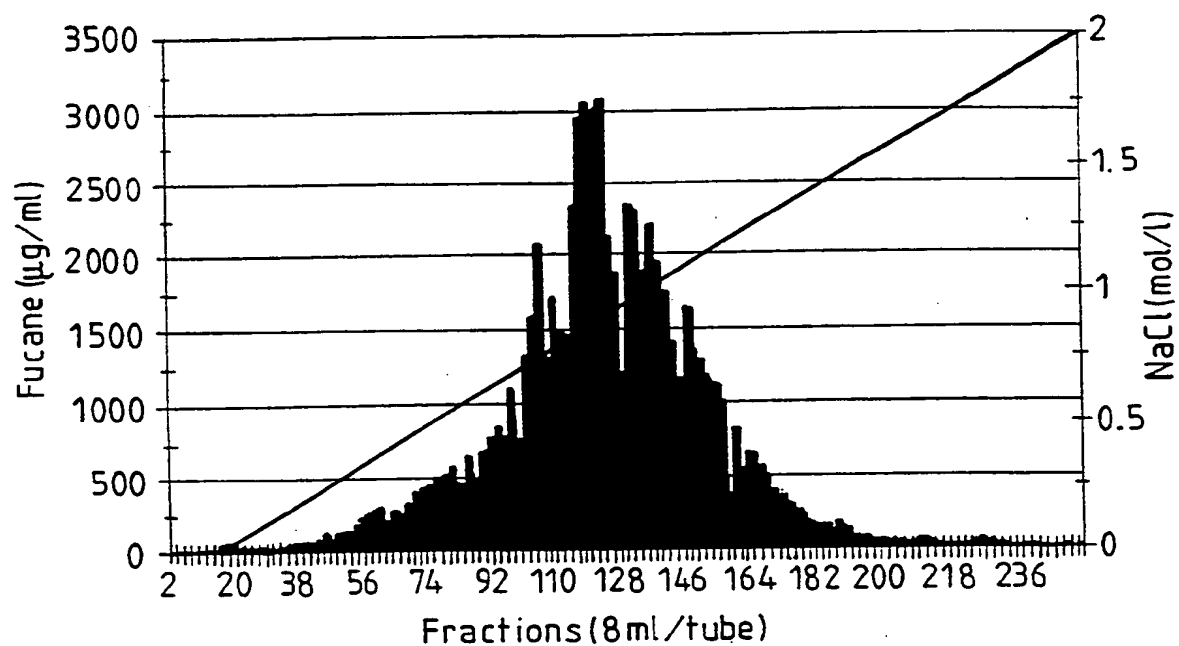
est effectuée sur une colonne DEAE Sépharose CL6B, est éluée à une force ionique correspondant à une concentration en NaCl supérieure à 0,8 M, de préférence supérieure à 1M.

- 5                    6) Fraction polysaccharidique de masse molaire inférieure ou égale à 10 000 g/mol, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé de dépolymérisation radicalaire selon une quelconque des revendications 1 à 5.

1 / 2

FIG. 1

2/2

FIG. 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | WO 86 06729 A (OPOCRIN S.P.A. LABORATORIO FARMACOBIOLOGICO) 20 November 1986<br>see page 5, line 4 - line 28<br>see examples 1-5  | 1,3-6                 |
| A          | ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,<br>vol. 200, no. 1, January 1992, SAN DIEGO,<br>,<br>pages 100-107, XP002021571<br>N. VOLPI ET AL.: "Low molecular weight<br>heparins and oligoheparins produced by gel<br>permeation enrichment or radical process:<br>Comparison of structures and<br>physicochemical and biological properties"<br>cited in the application<br>see page 101, right-hand column, line 10 -<br>page 102, left-hand column, line 25<br>---<br>-/-- | 1,3-6                 |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 1996

Date of mailing of the international search report

09.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/01314

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | <p>EP 0 403 377 A (INSTITUT FRANÇAIS DE<br/>RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER)<br/>19 December 1990<br/>cited in the application<br/>-----</p> |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01314

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |          |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|----------|
| WO-A-8606729                              | 20-11-86            | AR-A-                      | 240461              | 30-04-90 |
|   |                     | AU-B-                      | 601910              | 20-09-90 |
|   |                     | CA-A-                      | 1283098             | 16-04-91 |
|   |                     | EP-A-                      | 0221977             | 20-05-87 |
|   |                     | JP-B-                      | 2510177             | 26-06-96 |
|   |                     | JP-T-                      | 63500184            | 21-01-88 |
|   |                     | US-A-                      | 4973580             | 27-11-90 |
| -----                                     |                     |                            |                     |          |
| EP-A-403377                               | 19-12-90            | FR-A-                      | 2648463             | 21-12-90 |
|   |                     | AT-T-                      | 131176              | 15-12-95 |
|   |                     | AU-A-                      | 5841090             | 08-01-91 |
|   |                     | CN-A-                      | 1051564             | 22-05-91 |
|   |                     | DE-D-                      | 69023957            | 18-01-96 |
|   |                     | DE-T-                      | 69023957            | 04-07-96 |
|   |                     | EP-A-                      | 0676207             | 11-10-95 |
|   |                     | WO-A-                      | 9015823             | 27-12-90 |
|   |                     | JP-T-                      | 4506089             | 22-10-92 |
|   |                     | US-A-                      | 5321133             | 14-06-94 |
| -----                                     |                     |                            |                     |          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dr. nde Internationale No  
PCT/FR 96/01314

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C08B37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| A           | WO 86 06729 A (OPOCRIN S.P.A. LABORATORIO FARMACOBIOLOGICO) 20 Novembre 1986<br>voir page 5, ligne 4 - ligne 28<br>voir exemples 1-5<br>---   | 1,3-6                         |
| A           | ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,<br>vol. 200, no. 1, Janvier 1992, SAN DIEGO,<br>,<br>pages 100-107, XP002021571<br>N. VOLPI ET AL.: "Low molecular weight heparins and oligoheparins produced by gel permeation enrichment or radical process: Comparison of structures and physicochemical and biological properties"<br>cité dans la demande<br>voir page 101, colonne de droite, ligne 10<br>- page 102, colonne de gauche, ligne 25<br>---<br>-/-- | 1,3-6                         |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 Décembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09.01.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D nde Internationale No

PCT/FR 96/01314

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| A           | <p>EP 0 403 377 A (INSTITUT FRANÇAIS DE<br/>RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER)<br/>19 Décembre 1990<br/>cité dans la demande<br/>-----</p> |                               |



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs . . . membres de familles de brevets

D. . . de Internationale No

PCT/FR 96/01314

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO-A-8606729                                    | 20-11-86               | AR-A- 240461                            | 30-04-90               |
|   |                        | AU-B- 601910                            | 20-09-90               |
|   |                        | CA-A- 1283098                           | 16-04-91               |
|   |                        | EP-A- 0221977                           | 20-05-87               |
|   |                        | JP-B- 2510177                           | 26-06-96               |
|   |                        | JP-T- 63500184                          | 21-01-88               |
|   |                        | US-A- 4973580                           | 27-11-90               |
| -----   |                        |   |                        |
| EP-A-403377                                     | 19-12-90               | FR-A- 2648463                           | 21-12-90               |
|   |                        | AT-T- 131176                            | 15-12-95               |
|   |                        | AU-A- 5841090                           | 08-01-91               |
|   |                        | CN-A- 1051564                           | 22-05-91               |
|   |                        | DE-D- 69023957                          | 18-01-96               |
|   |                        | DE-T- 69023957                          | 04-07-96               |
|   |                        | EP-A- 0676207                           | 11-10-95               |
|   |                        | WO-A- 9015823                           | 27-12-90               |
|   |                        | JP-T- 4506089                           | 22-10-92               |
|   |                        | US-A- 5321133                           | 14-06-94               |
| -----   |                        |   |                        |

